PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: C07F 17/02, 17/00, G01N 33/48, C12O 1/68, C12N 9/16, C07H 23/00

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 97/09337

A1

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

13. März 1997 (13.03.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE96/01681

(22) Internationales Anmeldedatum: 6. September 1996 (06.09.96)

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT. SE).

(30) Prioritätsdaten:

195 33 093.5

7. September 1995 (07.09.95) DE Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WIESSLER, Manfred [DE/DE]; Konstanzer Strasse 21, D-69120 Heidelberg (DE). SCHÜTTE, Dagmar [DE/DE]; Unterer Burggraben 18, D-69221 Dossenheim (DE).

(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).

(54) Title: METALLOCENE-PHOSPHORAMIDITE CONJUGATES, PROCESS FOR THEIR PREPARATION AND THEIR USE

(54) Bezeichnung: METALLOCEN-PHOSPHORAMIDIT-KONJUGATE, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG SOWIE DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract

The invention concerns metallocene-phosphoramidite conjugates comprising one or a plurality of metallocenes and one or a plurality of phosphoramidites. The invention further concerns a process for preparing the metallocene-phosphoramidite conjugates and their use.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Metallocen-Phosphoramidit-Konjugate, die ein oder mehrere Metallocene und ein oder mehrere Phosphoramidite aufweisen. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der Metallocen-Phosphoramidit-Konjugate sowie deren Verwendung.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
ΑU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	Œ	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumānien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Тодо
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dānemark .	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

WO 97/09337

1

PCT/DE96/01681

Metallocen-Phosphoramidit-Konjugate, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie deren Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft Metallocen-Phosphoramidit-Konjugate, ein Verfahren zu ihrer Herstellung sowie deren Verwendung.

Bisher gab es Schwierigkeiten Oligonukleotide und Teile von DNA bzw. RNA im Elektronenmikroskop zu detektieren bzw. zu differenzieren. Es gibt bisher keine zufriedenstellende Möglichkeit, DNA bzw. RNA in reproduzierbarer Weise elektronenmikroskopisch sichtbar zu machen, um daran Studien durchführen zu können.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, ein Mittel bereitzustellen, mit dem durch einfache Veränderung der DNA bzw. RNA, möglichst schon bei der Synthese, ein Signal an der DNA bzw. RNA angebracht werden kann, um die DNA bzw. RNA besser elektronenmikroskopisch nachweisbar zu machen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Merkmale der Patentansprüche 1, 9, 12 und 14. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Bei dem erfindungsgemäßen Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat handelt es sich um Konjugate von einem oder mehreren Phosphoramiditen an ein oder mehrere Metallocene, bevorzugt Übergangsmetall-Metallocene, insbesondere Ferrocen, Ruthenocen oder Osmocen. Dabei können die in einem Konjugat vorkommenden Metallocene gleich oder verschieden sein. Zwischen dem Phosphoramidit und dem Metallocen befindet sich vorzugsweise noch ein Spacer, z.B. ein C₁-C₁₀-Alkylspacer, bevorzugt eine Propyl- oder Butylgruppe.

2

Bei dem erfindungsgemäßen Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat handelt es sich bevorzugt um Metallocenylalkyl-(2-cyanoethyl)-diisopropylamidophosphit, wobei das Metall ein Übergangsmetall ist, vorzugsweise Fe, Ru oder Os.

Das erfindungsgemäße Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat wird vorzugsweise im Rahmen der Oligonukleotidsynthese an ein Festphasen-gekoppeltes Oligomer addiert. Gute Ergebnisse werden erreicht, wenn das Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat im Vergleich zu den Oligonukleotiden im Überschuß eingesetzt wird. Bei der Oligonukleotidsynthese kommt es dann zu einer Metallocen-Markierung der DNA bzw. RNA, die elektronenmikroskopisch damit gut untersuchbar wird. Es ist natürlich auch möglich die DNA bzw. RNA nachträglich durch das Konjugat mit dem Metallocen zu markieren. Mit den metallocenmarkierten Oligonukleotiden lassen sich Feinstrukturen von DNA bzw. RNA im Elektronenmikroskop untersuchen. Antisense-Oligonukleotide können auf ihre Hybrdisierungseigenschaften hin untersucht werden, es kann zwischen spezifischen und unspezifischen Bindungen unterschieden werden, die Doppel- oder Tripel-Helix-Bildung kann verfolgt werden. Bei bekannter Sequenz lassen sich Strukturen im Elektronenmikroskop der Sequenz zuordnen. Außerdem kann bei Markierung verschiedener Oligonukleotide mit unterschiedlichen Metallocenen eine bevorzugte Hybridisierung gemessen werden. Mittels der Elektronenverlustspektroskopie kann man dabei einzelne Metallatome anhand ihrer charakteristischen Elektronenspektren nachweisen.

Die Herstellung der Metallocen-Phosphoramidit-Konjugate erfolgt beispielsweise über ein Verfahren, dessen Reaktionsschema in Fig. 1 dargestellt ist: Ein Metallocen (Übergangsmetall, bevorzugt Ferrocen, Ruthenocen oder Osmocen) wird mit einem Dicarbonsäurechlorid oder -anhydrid unter der Katalyse eines Friedel-Crafts-Katalysators zur Metallocenoylalkylcarbonsäure (I) umgesetzt. Die Ketofunktion im Molekül wird danach unter geeigneten Bedingungen hydriert, z.B. Hydrierung unter Katalyse eines PtO₂-Katalysator (II). Die Carbonsäurefunktion im Molekül wird dann durch Umsetzung mit einem Alkohol verestert (III) und anschließend unter geeigneten Bedingungen, z.B. durch Umsetzung mit LiAlH₄, reduziert (IV). Den entstandenen Alkohol (IV) kann man mit einem Phosphoramiditderivat, z.B. dem in der

3

Oligonukleotidsynthese üblichen Chloro-N,N-diisopropylamino-cyanoethoxy-phosphit (V), umsetzen. Das erhaltene Konjugat aus Metallocen und Phosphoramidit (VI) kann nun in der Oligonukleotidsynthese eingesetzt werden.

Die Markierung von (Oligo)nukleotiden während ihrer Synthese ist in Fig. 2 gezeigt. Das in Fig. 2 gezeigte Reaktionsschema ist beispielhaft für die durch die Umsetzung von Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat mit einem Nukleotid oder Oligonukleotid stattfindende Kopplung des (Oligo)nukleotids an das Metallocen. So wird das erfindunsgemäße Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat (VI) mit einem Festphasen-gekoppelten 5'-OH freien (Oligo)nukleotid mit einem Aktivator, z.B. Tetrazol, umgesetzt. Die entstehende Verbindung (VII) wird mit einem Oxidationsmittel, z.B. verdünnter Peroxidlösung, insbesondere 5%iger Cumolhydroperoxidlösung, umgesetzt, wobei eine Verbindung (VIII) entsteht. Unter Baseneinwirkung, z.B. Ammoniak, wird das an das Metallocen gekoppelte Nukleotid von der Festphase abgetrennt, wobei Verbindung (IX) entsteht.

Von den Erfindern wurde herausgefunden, daß die durch die Metallocene markierten (Oligo)nukleotide außer der guten Analysierbarkeit im Elektronenmikroskop eine andere interessante Anwendung haben, nämlich als künstliche Restriktionsenzyme. Es ist allgemein bekannt, daß im Körper Fremdstoffe durch Oxidation in eine wasserlösliche Form überführt werden. Das dafür benötigte Wasserstoffperoxid wird aus Sauerstoff zunächst durch Reduktion zu einem Superoxidanion (02.) hergestellt. Dieses Anion kann mit Hilfe der Superoxid-Dismutase zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid disproportionieren. Sind Eisen(II)-lonen vorhanden kann das intermediär entstehende H2O2 zu Hydroxylradikalen, die eine höchst reaktive Spezies darstellen, abreagieren. Findet diese Reaktion in der näheren Umgebung von DNA statt, kann die DNA ähnlich wie von einem Restriktionsenzym gespalten werden. Führt man die Spaltung künstlich herbei, fügt man ein Reduktionsmittel zu, z.B. Dithiothreitol (DTT), das aus dem Eisen (III) dann wieder Eisen (III) erzeugt, welches erneut reagieren kann. Ferrocen kann diese Reaktion als Eisen (II)-enthaltende Substanz auslösen. Wenn man ein Ferrocen-markiertes Oligonukleotid einsetzt, wird durch die Hybridisierung des Oligonukleotids gegen einzelsträngige

4

DNA (unter Bildung von Watson-Crick-Basenpaarung) oder auch doppelsträngige DNA (unter Bildung von Hoogsteen-Basenpaarung) das Eisen(II)-Ion in direkter Umgebung zur DNA an einer bestimmten Sequenz fixiert. Katalysiert dort das Eisen (II) die Spaltung von H_2O_2 kommt es durch die entstehenden reaktiven Hydroxylradikale bei der DNA an einer definierten Stelle zu einem Strangbruch. Idealerweise erfolgt dieses Schneiden nur an einer spezifischen Stelle der DNA. Das Beschriebene gilt natürlich anstelle von Eisen (II) auch für Ruthenium (II) und Osmium (III) in den jeweiligen Ruthenocenen und Osmocenen, sowie für alle Übergangsmetall-Metallocene, in denen das Übergangsmetall einfach durch Reduktion bzw. Oxidation in verschiedene Oxidationsstufen überführt werden kann.

Die Erfindung wird nun weiter mit Bezug auf die Figur erläutert:

Fig. 1: beispielhaftes Reaktionsschema für die Herstellung eines

Metallocen-Phosphoramidit-Konjugats

Fig. 2: Verwendung des Metallocen-Phosphoramidit-Konjugats in der

Oligosynthese zur Markierung von Oligonukleotiden mit Metal-

locenen

Die Erfindung wird nun weiter mit Bezug auf die nachfolgenden Beispiele beschrieben:

Beispiel 1: Herstellung von (5-Ferrocenylpentyl)-(2-cyanoethyl)-diisopropylamidophosphit

a) 4-Ferrocenoylbutansäure (I)

Zu 3,5 g (26 mmol) Aluminiumtrichlorid in 100 ml wasserfreiem CH₂Cl₂ wurde eine Mischung aus 5,0 g (27 mmol) Ferrocen und 2,3 g (20 mmol) Glutarsäureanhydrid in 100 ml CH₂Cl₂ getropft. Die Lösung färbt sich dabei violett. Nach 3 h unter Rückfluß wurde der Ansatz hydrolysiert und zur Entfernung von Reaktionsproduk-

5

ten, die weder in wässriger noch in organischer Phase löslich sind, durch eine Fritte gesaugt. Die wässrige Phase wurde anschließend abgetrennt und die organische Phase dreimal mit Wasser gewaschen, mit NaSO₄ getrocknet und eingeengt.

Ausbeute: 3,5 g (58,3 % d. Th.)

DC:R, (Kieselgel, CHCL₃/MeOH 95:5): 0,6

<u>SC</u>: Alox, sauer (Akt. III), 1) CH_2Cl_2 ; 2) $CH_2Cl_2/MeOH$ 1:1 + 5 Vol-% HOAc <u>1H-NMR (250 MHz) CDCl_3</u>: δ = 4,76-4,75 (t, 2H, Cp subst.); 4,51-4,50 (t, 2H, Cp subst.); 4,19 (s, 5H, Cp unsubst.); 2,82-2,76 (t, 2H, CH₂-C(O)); 2,40-2,34 (t, 2H, CH₂-COO); 1,90-1,86 (m, 2H, C-CH₂-C)

MS: (C₁₅H₁₆FeO₃, 300,04), m/z = 300 (M⁺, 100 %)

b) 5-Ferrocenylpentansäure (II)

2,0 g (6,66 mmol) 4-Ferrocenoylbutansäure (I) wurden in einem Dreihalskolben mit 50 ml Eisessig gelöst, der anschließend mit Stickstoff gespült wurde. 100 mg Platinoxid wurden als Katalysator zugefügt. Der Kolben wurde abermals mit Stickstoff gespült und dann mit Wasserstoff beladen. Nach 18 h ist die Hydrierung abgeschlossen und der Katalysator wird abgesaugt. Der Reaktionsansatz wird mit 100 ml H₂O verdünnt und 5x mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden noch 2x mit H₂O gewaschen, mit NaSO₄ getrocknet, eingeengt und chromatographiert.

Ausbeute: 1,91 g (98 % d. Th.)

DC: R_t, (Kieselgel, CHCl₃/MeOH 95:5): 0,65

<u>SC</u>: Alox, sauer (Akt.III), 1) CH_2CI_2 ; 2) $CH_2CI_2/MeOH$ 95:5 + 5 Vol-% HOAc <u>1H-NMR (250 MHz) CDCL</u>₃: δ = 4,08 (s, 5H, Cp unsubst.); 4,03 (s, 4H, Cp subst.); 2,37-2,32 (m, 4H, Fc-CH₂, CH₂-COOH); 1,67-1,55 (m, 4H, 2xCH₂) MS: (C₁₅H₁₈FeO₂, 286,07), m/z = 286 (M⁺, 100%); 199 (Fc-CH₂, 31 %); 121 (FeCp, 40%)

6

c) 5-Ferrocenylpentansäureethylester (III)

Zu 1 g (3,5 mmol) 5-Ferrocenylpentansäure (II) und 500 µI Ethanol in THF wurde 1 g (4,8 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am nächsten Tag wurde der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, der Reaktionsansatz eingeengt und ohne weiteres Aufarbeiten chromatographiert.

Ausbeute: 692 mg (63 % d. Th.)

DC: Rf (Kieselgel, CHCl3); 0,8

SC: Alox, neutral (Akt.III), PE/EE 9:1

<u>¹H-NMR (250 MHz) CDCl</u>₃: δ = 4,17-4,10 (q, 2H, O-CH₂); 4,08 (s, 5H, CP unsubst.); 4,04-4,03 (m, 4H, Cp subst.); 2,37-2,28 (m, 4H, Fc-CH₂, CH₂-COO); 1,72-1,51 (m, 4H, 2x CH₂)

MS: $(C_{17}H_{22}FeO_2, 314,09)$, m/z = 314 (M⁺, 32,6%); 206 (M⁺-Cp-OEt, 49,2 %); 163 (FeCp-CH₂-CH = CH₂, 83,6%), 55 (C₄H₇, 100 %)

d) 5-Ferrocenylpentanol (IV)

Zu 0,5 g (160 mmol) 5-Ferrocenylpentansäureethylester (III) in 20 ml THF wurden 61 mg (1,60 mmol) LiAlH₄, gegeben und 2 h bei RT gerührt. Der Ansatz wurde hydrolysiert, es wurden 50 ml Dichlormethan zugegeben, mit 2 molarer Salzsäure neutralisiert und dreimal mit $\rm H_2O$ gewaschen, mit $\rm NaSO_4$ getrocknet und eingeengt.

Ausbeute: 378 mg (89 % d.Th.)

 \underline{DC} : $R_f(Alox, CH_2CI_2) = 0.2$

SC: Alox, neutr. (Akt.III), CH₂Cl₂

 $_1$ H-NMR (250 MHz) CDCl₃: δ = 4,08 (s, 5H, Cp unsubst.); 4,10-4,02 (m, 4H, Cp subst.); 3,68-3,61 (dt, 2H, CH₂-OH); 2,37-2,31 (m, 2H, Fc-CH₂), 1,65-1,49 (m, 4H, 2x CH₂); 1,45-1,35 (m, 2H, CH₂)

<u>MS</u>: ($C_{15}H_{20}FeO$, 272,08), m/z = 272 (M⁺, 100%); 199 (Fc-CH₂, 20,2 %); 121 (FeCp, 22,4 %)

7

e) (5-Ferrocenylpentyl)-(2-cyanoethyl)-diisopropylamidophosphit (VI)

0,150 g (0,55 mmol) des 5-Ferrocenylpentanols (IV) wurden zweimal mit THF eingeengt, mit 5ml THF aufgenommen und 376 μ l (2,2 mmol) Hünig-Base zugefügt. Zu dieser Reaktionsmischung wurden 195 μ l (0,83 mmol) Chloro-N,N-diisopropylamino-cyanoethoxyphosphin (V) mit Hilfe einer Spritze über ein Septum zugetropft. Nach 15 min bei RT wurden 50 μ l H₂O zugegeben und weitere 30 Minuten gerührt. Der Ansatz wurde in 20 ml EE/NEt₃ aufgenommen und mit 10 % NaHCO₃-Lösung ausgeschüttelt, anschließend 2 x mit Wasser gewaschen, mit NaSO₄ getrocknet und eingeengt.

Ausbeute: 164 mg (94 % d.Th.)

 \underline{DC} : R_f(Alox, CH₂CI₂) = 0,61

SC: KG, PE/EE/NEt₃ 18:1:1

<u>1H-NMR (250 MHz) CDCl₃</u>: δ = 4,08 (s, 5H, Cp unsubst.); 4,04-4,02 (m, 4H, Cp subst.); 3,89-3,75 (2x sep, je 1H, NCHMe₂); 3,70-3,52 (m, 4H, CH₂-Cyanoethyl, 5"-H₂); 2,65-2,60 (t, 2H, CH₂-CN); 2,36-2,30 (m, 2H, 1"-H₂); 1,68-1,35 (m, 6H, 3x CH₂); 1,20-1,16 (4x s, je 3H, 4x CH₃)

<u>MS</u>: $(C_{24}H_{37}FeN_2 O_2P, 472,19)$, m/z = 472 (M⁺, 14,4 %); 389 (M⁺-N((CH(CH₃)₂-CN, 63,0 %); 121 (FeCp, 100 %)

Beispiel 2: Markierung von Oligonukleotiden mit Ferrocen

a) (5-Ferrocenylpentyl)-(2-cyanoethyl)-(3'-O-acetyl-2'-desoxythymidin-5')phosphittriester (VII)

50 mg (0,18 mmol) 3'-O-Acetyl-2'-desoxythymidin und 20 mg (0,29 mmol) Tetrazol wurden zweimal mit 5 ml wasserfreiem CH_3CN eingeengt und mit 5 ml CH_3CN aufgenommen. Dazu wurden langsam 100 mg (0,21 mmol) des Phosphoramidites (VI) in 10 ml CH_3CN getropft, welches zuvor ebenfalls zweimal mit CH_3CN eingeengt worden war. Nach einer Stunde Rühren bei RT wurden dem Ansatz 100 ml PE/EE 9:1 zugefügt, mit 10 % $NaHCO_3L\ddot{o}sung$, 2x mit H_2O gewaschen und eingeengt.

8

Ausbeute: 103 mg (88 % d.Th.)

 \underline{DC} : R_f(KG, CHCl₃/MeOH 95/5) = 0.5

SC: KG, CHCl₃/MeOH/NEt₃ 98/1/1

b) Triethylammonium-(5-ferrocenylpentyl)-(3'-O-acetyl-2'-desoxythymidin-5')-phosphat (VIII)

103 mg (0,15 mmol) des Phosphittriesters (VII) wurden mit 1 ml einer 5 % Cumolhydroperoxid-Lösung in CH_3CN versetzt. Nach 3 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von $100\mu l$ Isopropanol gestoppt. Der Ansatz wurde mit 1 ml Triethylamin versetzt und ohne weiteres Aufarbeiten vorsichtig eingeengt und sofort chromatographiert. Die Cyanoethoxy-Gruppe wird dabei durch das Triethylanim abgespalten.

Ausbeute: 104 mg (93 % d.Th.)

<u>DC</u>: $R_f(KG, CHCl_3/MeOH 95/5) = 0.2$

SC: KG, CHCl₃/MeOH/NEt₃ 98 1/1

<u>¹H-NMR (250 MHz) CDCl₃</u>: δ = 7,77 (q, 1H, 6-H); 6,29-6,24 (dd, 1H, 1′-H); 5,29-5,28 (dt, 1H, 3′-H); 4,12-4,08 (m, 2H, Cp subst.); 4,06 (s, 5H, Cp unsubst.); 4,05-3,98 (m, 5H, Cp subst., 4′H, 5′H₂); 3,84-3,76 (dt, 2H, 5"-H₂); 2,32-2,22 (m, 4H, 2′-H, 1"-H₂); 2,03 (s, 3H, C(0)CH₃); 1,84 (d, 3H, 5-CH₃); 1,66-1,42 (m, 6H, 3xCH₂) $J_{5-Me,6}$ = 1,18; $J_{1',2'}$ = 6,53; $J_{5',P}$ = 6,45; $J_{6',P}$ = 6,45

c) Triethylammonium-(5-ferrocenylpentyl)-2'-desoxythymidin-5')phosphat (IX)

Der Phosphatdiester (VIII) wurde mit 1 ml MeOH/H₂O/NEt₃ 4:2:1 versetzt. Nach einer halben Stunde wurde der Ansatz eingeengt, zweimal mit Ethanol aufgenommen und erneut eingeengt.

<u>'H-NMR (250 MHz) CDCI₃</u>: $\delta = 7,66$ (q, 1H, 6-H); 6,21-6,16 (dd, 1H, 1'-H); 4,40-4,35 (m, 1H, 3'-H); 4,22-4,20 (dd, 2H, Cp subst.); 4,10-3,87 (m, 7H, Cp subst., 4'H, 5'-H₂); 4,06 (s, 5H, Cp unsubst.); 3,81-3,73 (dt, 2H,6"-H₂); 2,33-2,27 (m,

9

2H, 1"- H_2); 2,18-2,11 (m, 2H, 2'-H); 1,85 (d, 3H, 5- CH_3); 1,66-1,44 (m, 4H, 2x CH_2); 1,43-1,28 (m, 2H, CH_2) $J_{5-Me.6} = 1,22; J_{1',2'} = 6,55; J_{5',P} = 6,53$

Beispiel 3: Allgemeine Vorschrift zur Synthese der Triethylammonium-(5-ferrocenylpentyl)-(2'-desoxynukleosid-5')-phosphate an der Festphase

Die Säulen mit der Festphase enthalten in der Regel 0,2 μ mol eines Nukleosides. In diesem Fall jedoch wurden Festphasen mit der Beladung 1 μ mol gewählt, um eine spektroskopische Untersuchung zu ermöglichen. Die Säulen die in der automatisierten Oligonukleotidsynthese verwendet werden, sind so beschaffen, daß man auf beiden Seiten eine Luer-Spritze aufsetzen kann. Man kann so die Säule mit den gewünschten Reaktionspartnern oder Lösungsmitteln spülen, indem man sie von einer Spritze in die andere drückt. Die Festphasensynthese wurde mit allen vier Desoxynukleosiden durchgeführt:

- 1. Abspalten der Dimethoxytritylschutzgruppe: 2x je 1 ml 3% Dichloressigsäure in Dichlormethan für 1 min
- 2. Spülen mit dem Abspaltungsreagenz bis das Eluat farblos ist
- 3. Spülen mit mindestens 5x1 ml Dichlormethan, zum Entfernen jeglicher Säurespuren
- 4. Restliches Lösungsmittel an der Wasserstrahlpumpe bis zur Trockene abziehen
- 5. Belüften mit Argon
- 6. Kopplung: 180 μl einer Tetrazol-Lösung (35 mg/ml) in Acetonitril und 23,6 mg (50 μmol) des Phosphoramidites (VI) in 500 μl Acetonitril werden gemischt und sofort auf die Festphase gegeben. Nach 3 min wird das Reaktionsgemisch grob ausgespült und der Vorgang wiederholt.
- 7. Spülen mit mindestens 5x 1 ml Acetonitril
- 8. Oxidation: 1 ml einer 5% Cumolhydroperoxid in Acetonitril für 2 min
- 9. Spülen mit mindestens 5x 1 ml Acetonitril
- 10. Abziehen des restlichen Lösungsmittels an der Wasserstrahlpumpe

- Festphase mit 1 ml einer konzentrierten Ammoniak/Methylamin-Lösung (jeweils ca. 10-30%) 5 min inkubieren
- Lösung in ein verschraubbares Eppendorf-Reaktionsgefäß spülen und für 1 h bei 55°C inkubieren.

Anschließend wird der Reaktionsansatz am Lyophilisator und zur Weiterverarbeitung mit 1 ml TEAA/CH₃CN 1:1 aufgelöst.

Verbin-	λ _{max} Fc-dN	λ _{max} dNMP ¹	Rt-Zeit ²	OD	Ausbeute
	[nm]	[nm]	[min]		[%]
Fc-dT	264	267	33	2,28	23,7
Fc-dC	270	271	31	2,78	30,5
Fc-dG	252	252	24	3,85	28,8
Fc-dA	257	259	34	2,17	14,1

1nach Maniatis, Sambrook, 1989

²Die HPLC wurde auf einer präparativen RP₁₈-Säule durchgeführt. Fluß 4 ml/min, 25 %-75% B in 40 min, A: 90 % TEAA/10 % CH_3CN , B: 10 % TEAA/90 % CH_3CN

Die Absoprtion des Ferrocens ist bei dieser geringen Menge zu vernachlässigen. Zur Berechnung der Ausbeute wurden die Absorbtionswerte für die entsprechenden dNMPs herangezogen.

Triethylammonium-(5-ferrocenylpentyl)-(2'-desoxythymidin-5')-phosphat MS (ESI): ($C_{25}H_{33}FeN_2O_3P$, 576,16): m/z = (575,1 [M-H]); (449,0 [M-Thymin-H]); (383,0 [M-Thymin-Cp-H]); (351,1 [Fc-(CH_2)₅-O-PO₃]); (285,1 ($CpFe-(CH_2)_5-O-PO_3$); 11

(125,2 [Thymin-H])

Triethylammonium-(5-ferrocenylpentyl)-(2'-desoxycytidin-5')-phosphat

MS (ESI): $(C_{24}H_{32}FeN_3O_7P, 561,13)$: m/z = (560,1 [M-H]);

Triethylammonium-(5-ferrocenylpentyl)-(2'-desoxyguanosin-5')-phosphat

<u>MS (ESI)</u>: $(C_{25}H_{32}FeN_5O_7P, 601, 14)$: m/z = (600, 1 [M-H]);

Triethylammonium-(5-ferrocenylpentyl)-(2'-desoxyadenosin-5')-phosphat

<u>MS {ESI}</u>: $(C_{25}H_{32}FeN_5O_6P, 585, 14)$: $m/z = (584, 1 [M-H]^*); (448, 8, [M-Adenin-H]^*); (383, 1 [M-Adenin-Cp-H]^*); (350, 9 [Fc-(CH₂)₅-O-PO₃]^*) (285, 1 [CpFe-(CH₂)₅-O-PO₃]^*); (134, 2 [Adenin-H]^*) (586, 0 [M+H]^*) (352, 1 [Fc-(CH₂)₅-O-PO₃+H]^*); (136, 2 [Adenin+H]^*)$

Ferrocenylverknüpftes 4-mer

Die Sequenz 5 TGAC 3 wurde mit der automatisierten Oligonukleotidsynthese (1 μ mol) hergestellt. Die Dimethoxytrityl-Gruppe am Ende des letzten Nukleotids wurde dann von Hand abgespalten und weiterhin so verarbeitet wie auch die Monomere. Die präparative HPLC wurde unter geänderten Bedingungen durchgeführt.

HPLC: RP₁₈-Säule, Fluß 4 ml/min, 10 %-50 % B in 40 min und 10 min bei 50 %,

A: 90 % TEAA/10 % CH₃CN, B: 10 % TEAA/ 90 % CH₃CN

Retentionszeit 4-mer: 43 min

<u>MS (ESI)</u>: $(C_{54}H_{69}FeN_{15}O_{25}P_{49} 1507,28)$: m/z = (1506,9 [M-H]; (1064,5 [M-

Cytidin-CpFe-OH]); (619,0 [pApC])

Ferrocenylverknüpftes 27-mer

Das 27-mer mit der Sequenz

5'TTC CTC CTT CCT TCC TTC CTT CCT CCC3'

wurde am Oligonukleotidsynthesizer hergestellt und das Ferrocen mit der Hand analog zu den Monomeren und dem 4-mer addiert.

12

Die Analytik mit Hilfe der HPLC lief unter den gleichen Bedingungen wie bei dem 4-mer:

Retentionszeit Ferrocenylverknüpftes 27-mer: 35,3 min

Patentansprüche

- 1) Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat, dadurch gekennzeichnet, daß es ein oder mehrere Metallocene und ein oder mehrere Phosphoramidite aufweist.
- 2) Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das oder die Metallocene über einen Spacer an das oder die Phosphoramidite gebunden sind.
- 3) Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Metallocen ein Übergangsmetall-Metallocen ist.
- 4) Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Metallocen Ferrocen, Ruthenocen oder Osmocen ist.
- 5) Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat nach einem der Ansprüche 2-4, dadurch gekennzeichnet, daß der Spacer eine C_1 C_{10} Alkylgruppe ist.
- 6) Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die in dem Konjugat vorhandenen Metallocene gleich oder verschieden sind.
- 7) Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Phosphoramidit-Bestandteil aus der Verbindung Chloro-N,N-diisopropylamino-cyanoethoxyphosphit stammt.
- 8) Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat um Metallocen-ylalkyl-(2-cyanoethyl)-diisoproylamidophosphithandelt, wobei das Metall ein Übergangsmetall, insbesondere Eisen, Ruthenium oder Osmium ist.

- 9) Verfahren zur Herstellung eines Metallocen-Phosphoramidit-Konjugats, dadurch gekennzeichnet, daß es folgende Schritte aufweist:
- a) Umsetzung eines Metallocens mit einem Dicarbonsäureanhydrid oder -chlorid zu einer Metallocenoylalkylcarbonsäure (I),
- b) Reduktion der in Schritt a) erhaltenen Verbindung zu einem Alkohol,
- c) Umsetzung des in Schritt b) erhaltenen Alkohols mit einem Phosphoramiditderivat unter Erhalt des Metallocen-Phosphoramidit-Konjugats.
- 10) Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Metallocen ein Übergangsmetall-Metallocen ist, insbesondere Ferrocen, Ruthenium oder Osmium ist.
- 11) Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß das in Schritt c) verwendete Phosphoramiditderivat Chloro-N,N-diisopropylamino-cyano-ethoxyphosphit ist.
- 12) Verwendung eines Metallocen-Phosphoramidit-Konjugats zur elektronenmikroskopisch detektierbaren Markierung von Oligonukleotiden bzw. DNA bzw. RNA.
- 13) Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung während der Oligonukleotidsynthese stattfindet.
- 14) Verwendung von Metallocen-markierten Oligonukleotiden als künstliche Restriktionsenzyme.

FIG. 1

1/2

2/2

O-CH2-CH2-CN CH2-(CH2)n-CH2-0-1 Festphase (VI) NC-(CH₂)₂-O Tetrazol (VIT) Festphase 5% Cumolhydroperoxid NC-(CH₂)₂-O (VIII) Festphase NH₃ NC-(CH₂)₂-0

(IX)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PL./DE 96/01681

A. CLASSI IPC 6	FICATION OF SUBJECT MATTER C07F17/02 C07F17/00 G01N33/46 C07H23/00	B C12Q1/68 C12N9/1	L6
According to	International Patent Classification (IPC) or to both national classifi	cation and IPC	
	SEARCHED		
Minimum de IPC 6	ocumentation searched (classification system followed by classification CO7F GO1N C12Q C12N CO7H	on symbols)	
Documentat	ion searched other than minimum documentation to the extent that s	uch documents are included in the fields search	ned
Electronic d	ata base consulted during the international search (name of data base	and, where practical, search terms used)	
C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the re-	levant passages	Relevant to claim No.
P,X	CHEMICAL COMMUNICATIONS, no. 4, 1996, pages 555-557, XP002022094 MUCIC, R.C. ET AL.: "synthesis a characterization of dna with ferr groups attached to their 5'-termi electrochemical characterization redox-active nucleotide monolayer see the whole document	rocenyl ni: of a	1-8
X Fur	ther documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members are listed in a	nnex.
*Special categories of cited documents: The document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance are relevance. E' earlier document but published on or after the international filing date. The document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified). The document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means. The later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention. The document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is ecombined with one or more other such document, such combination being obvious to a person skilled in the art. The document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention. The document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention. The document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention. The document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention. The document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application or cited to understand the principle or theory underlying the invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents. The document published after the intern		the application but by underlying the imed invention considered to ment is taken alone imed invention the step when the other such docu- to a person skilled	
	e actual completion of the international search	Date of mailing of the international search	
	3 January 1997	3 1. 01. 97	
Name and	mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Rinkel, L	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PL./DE 96/01681

		PC./DE 96/01001			
	(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.			
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 11, 12 September 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 134702f, DEBITSUDO, A.: "preparation of oligonucleotide having redox group" XP002022095 see abstract	1-8			
X	& JP 06 041 184 A (MITSUBISHI CHEMICAL INDUSTRIES) 15 February 1994	1-8			

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PL./DE 96/01681

A. KLASSII IPK 6	FIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES C07F17/02 C07F17/00 G01N33/48 C07H23/00	C12Q1/68 C12N	9/16
B. RECHE	ternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Kla RCHIERTE GEBIETE Ier Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbol CO7F GO1N C12Q C12N C07H		
	te aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, sow r internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Na		
C. ALS WI	ESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	e der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	CHEMICAL COMMUNICATIONS, Nr. 4, 1996, Seiten 555-557, XP002022094 MUCIC, R.C. ET AL.: "synthesis and characterization of dna with ferror groups attached to their 5'-terminelectrochemical characterization redox-active nucleotide monolayer siehe das ganze Dokument	ocenyl ni: of a	1-8
Besonder A Veröf aber E älteres Anne L Veröf scheie ander soll c ausge O Veröf eine P Veröf dem Datum des	ffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist s Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen eldedatum veröffentlicht worden ist fentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft ernen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer ren im Recherchenbericht genannten Veröffentlichungsdatum einer ren im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie stührt) ffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht	Siehe Anhang Patentfamilie T Spätere Veröffentlichung, die nach doder dem Prioritätsdaum veröffentlichung und hanneldung nicht kollidiert, sondern Erfindung zugrundeliegenden Prinzi Theorie angegeben ist X Veröffentlichung von besonderer Bekam allein aufgrund dieser Veröffenterischer Tängkeit beruhend beveröffentlichung von besonderer Bekam nicht als auf erfinderischer Täwerden, wenn die Veröffentlichung Veröffentlichungen dieser Kategorie diese Verbindung für einen Fachma & Veröffentlichung, die Mitglied derse Absendedatum des internationalen in 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1,	cht worden ist und mit der nur zumVerständnis des der ps oder der ihr zugrundeliegenden deutung; die beanspruchte Erfindung stichung nicht als neu oder auf trachtet werden deutung; die beanspruchte Erfindung igkeit beruhend betrachtet mit einer oder mehreren anderen in Verbindung gebracht wird und nn naheliegend ist lben Patentfamilie ist
Name und	1 Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Rinkel, L	

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PC., DE 96/01681

C (Forteern	mg) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		70701001
Kategorie*		ommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 11, 12.September 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 134702f, DEBITSUDO, A.: "preparation of oligonucleotide having redox group" XP002022095		1-8
X	siehe Zusammenfassung & JP 06 041 184 A (MITSUBISHI CHEMICAL INDUSTRIES) 15.Februar 1994		1-8